

Projeto de Iniciação Científica – Programa PIBIC

## **Modificação genética de microrganismos para a produção de biocombustíveis**

**Pesquisador Responsável:** Dr. Leandro Vieira dos Santos

**Instituição sede:** Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE; Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM

### **Introdução e estado da arte**

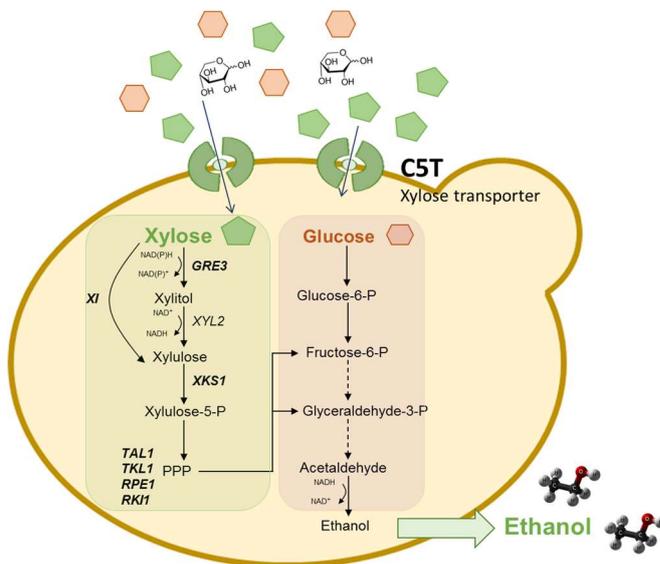
A matriz energética mundial é altamente dependente do uso de fontes fósseis e não-renováveis como o petróleo, carvão e gás. A intensificação do uso de combustíveis fósseis contribui com a emissão de Gases causadores do Efeito Estufa (GEE), levando a níveis alarmantes de emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera (Scripps Institutions of Oceanography, 2018; Abas et al. 2015). Visando limitar o aumento da temperatura global, é essencial o desenvolvimento e emprego de fontes energéticas renováveis e mais sustentáveis (Bezerra and Ragauskas, 2016). Nesse contexto, um recurso energético capaz de atender tais requisitos é o etanol de segunda-geração (2G), o qual utiliza os açúcares presentes da biomassa, podendo elevar cerca de 30 a 40% a produção de etanol convencional (Martins et al., 2014).

O etanol de segunda geração é produzido a partir dos polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal, uma matriz renovável e com capacidade de ser utilizada em larga escala pela indústria. A desconstrução das frações de celulose e hemicelulose da parede celular vegetal libera os açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados para a produção de etanol (Morais et al., 2017). Um dos maiores desafios na implementação dessa tecnologia é o desenvolvimento de linhagens de micro-organismos capazes de utilizar os açúcares provenientes desse material e converter em etanol.

Esse projeto visa modificar proteínas que assimilam o açúcar renovável xilose por uma linhagem industrial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a eficiente produção de etanol 2G. Linhagens modificadas de *S. cerevisiae* não são capazes de integralizar eficientemente a pentose xilose dentro da célula, tornando a produção de etanol 2G pouco eficiente. Tendo em vista a significativa parcela desse açúcar na constituição da biomassa lignocelulósica (25-30%), é imprescindível o

desenvolvimento de uma cepa capaz de assimilar eficientemente esse grupo de açúcar a fim de tornar o processo economicamente viável (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

A etapa inicial do processo envolve a assimilação desse açúcar por transportadores localizados na membrana celular da levedura (figura 1). Após internalizado, a levedura desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa possui os genes e vias metabólicas necessários para converter a xilose em etanol. Apesar da grande importância dessa etapa para o aumento na eficiência do processo 2G, nenhum transportador de grande eficiência foi desenvolvido para solucionar esse desafio tecnológico. Dessa maneira, o desenvolvimento de um transportador eficiente no carregamento de xilose para o ambiente intracelular, aumentará a eficiência do processo fermentativo. Alguns trabalhos prévios na literatura relatam melhorias em transportadores endógenos de açúcar através de engenharia evolutiva (Farwick et al. 2014) e mutações sítio específica (Farwick et al. 2014; Nijland et al. 2016). Dessa forma, este projeto tem como objetivo caracterizar novas sequências de transportadores de xilose e desenvolver uma linhagem modificada geneticamente para eficiente produção de etanol 2G.



**Figura 1| Transportadores de açúcares *S. cerevisiae*.** A proteína de membrana C5T será modificada geneticamente, apresentando maior afinidade por xilose. A maior velocidade de assimilação dos açúcares impacta diretamente no processo de produção industrial do etanol 2G.

## Objetivos

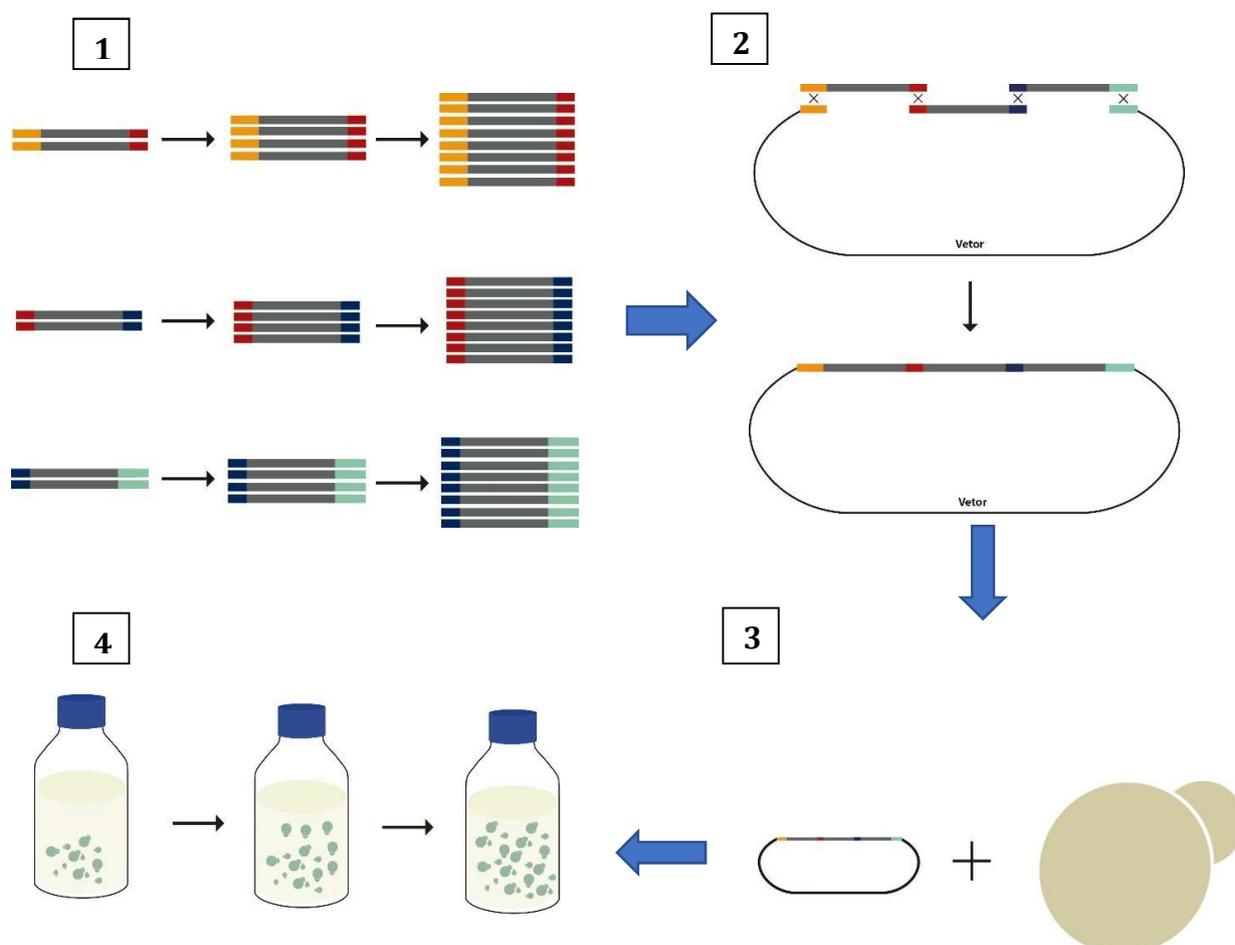
O objetivo desse projeto é a caracterização e o desenvolvimento de transportadores de xilose que possuam uma alta capacidade de assimilar esse açúcar intracelularmente, diminuindo o tempo final de fermentação e produção do etanol 2G.

Ao longo do projeto, o candidato selecionado desenvolverá os seguintes passos:

- Geração de mutações sítio-específica em transportadores de açúcar;
- Construção de cassetes de expressão gênica;
- Transformação genética da levedura *S. cerevisiae* para introdução do transportador;
- Ensaio fermentativo das linhagens desenvolvidas e análise dos resultados.

## Metodologia

O candidato selecionado será capacitado em técnicas tradicionais de biologia molecular, como: reações de PCR, extração de DNA plasmidial e genômico, eletroporação bacteriana, clonagem, construção de cassetes de expressão gênica, transformação da levedura modelo *S. cerevisiae*, ensaios de fermentação, entre outros (Gibson *et al.* 2009; Joska *et al.* 2014);(Gietz and Schiestl 2008);(Sambrook *et al.* 1989).



**Figura 2 | Metodologia gráfica simplificada do projeto.** Etapas de desenvolvimento inicial do projeto: reações de polimerase em cadeia (PCR) para inserção de mutações e amplificação de regiões específicas do DNA, como promotores, terminadores e regiões codificadoras, etapa 1; montagem de cassetes de expressão gênica, etapa 2; introdução do plasmídeo desenvolvido na levedura, etapa 3; e por fim, ensaio fermentativo para avaliar alterações fenotípicas das linhagens desenvolvidas e avaliar a produção do etanol 2G, etapa 4.

## Referências

- Abas N, Kalair A, Khan N. Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures* 2015;**69**:31–49.
- Bezerra, T.L., and Ragauskas, A.J. (2016). A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 10, 634–647.
- Farwick A, Bruder S, Schadeweg V *et al.* Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:5159–64.
- Gibson DG, Young L, Chuang RY *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009;**6**:343–5.
- Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc / SS carrier DNA / PEG method. *Nat Protoc* 2008;**2**:31–5.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 147-177, 2007.
- Joska TM, Mashruwala A, Boyd JM *et al.* A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *J Microbiol Methods* 2014;**100**:46–51.
- Martins, F.D.A., Martim, T., Corrêa, A.M., Oliveira, F.F.D., Araújo, F. De, Epa, M., and Mourão, U.C. (2014). A produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar. *Rev. Latino-Americana Inovação e Eng. Produção* 2, 5–16.
- Morais, P.P., Pascoal, P.V., Rocha, E. de S., and Martins, E.C.A. (2017). Etanol de 2 geração : atual produção e perspectivas. *Bioenergia Em Rev. Diálogos* 7, 45–57.
- Nijland JG, Vos E, Shin HY *et al.* Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 2016;**9**:158.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold, 2001.
- Scripps Institutions of Oceanography. The Keeling Curve. Disponível em <https://scripps.ucsd.edu/programs/keelingcurve/>. Acesso em abril de 2019.